

CHROM. 8266

## Note

---

### Gibberelline

#### **XXXIV. Mitt.\* Beitrag zur Gaschromatographie von Gibberellinen und Gibberellin-O-glucosiden — N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid als Silylierungsreagens**

GERNOT SCHNEIDER, SIEGFRIED JÄNICKE und GÜNTHER SEMBDNER

*Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der D.D.R., 401 Halle (Saale), Weinberg (D.D.R.)*

(Eingegangen am 18. Februar 1975)

Für gaschromatographische Untersuchungen von Gibberellinen (GA), die mehrfach beschrieben worden sind<sup>2,3</sup>, werden überwiegend zwei Derivate eingesetzt: (1) die Methylester (GA-Me), die aus den freien Gibberellinen mit Diazomethan leicht darstellbar sind<sup>4,5</sup> und (2) die Trimethylsilyläther der Methylester (TMS-GA-Me), die aus den Methylester mit Hexamethyldisilazan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TMCIS) zu gewinnen sind<sup>6</sup>. Die Herstellung der TMS-GA-Me aus den freien Gibberellinen erfordert somit eine Zweistufenreaktion, bietet aber bei Vorhandensein freier Hydroxylgruppen die Möglichkeit, von Gibberellinen nacheinander die GA-Me und die TMS-GA-Me gaschromatographisch untersuchen zu können.

Für unser Problem, nach chemisch-präparativer Entmethylierung von GA-Me nach Bartlett und Johnson<sup>7</sup> neben freier Säure Reste von Methylestern gaschromatographisch nachzuweisen<sup>8</sup>, sind weder die GA-Me noch die TMS-GA-Me geeignet. Deshalb versuchten wir, die erstmals von Davis *et al.*<sup>9</sup> für Phytohormone (Kinetin, Auxin und GA<sub>3</sub>) angewendete Silylierungsmethode mit N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) zu standardisieren. Da BSA in der Lage ist, sowohl Hydroxylgruppen als auch Carboxylgruppen zu silylieren, sind aus einem Gemisch von GA und GA-Me die Trimethylsilyläther der Gibberellin(trimethylsilylester) (TMS-GA-TMS) und die Trimethylsilyläther der Gibberellinmethylester (TMS-GA-Me) zu erwarten. Für deren gaschromatographische Trennung waren geeignete Bedingungen auszuarbeiten.

Weiterhin sollte die Anwendbarkeit der "BSA-Silylierung" für GA-O-glucoside<sup>10,11</sup> geprüft werden, da deren Umsetzung zu den Methylestern oftmals unvollständig ist<sup>8</sup>.

### EXPERIMENTELLES

#### *Silylierung*

Für die Silylierung benutzten wir BSA bzw. ein Gemisch von BSA mit 5–10% TMCIS. Die getrockneten Proben der Gibberelline, GA-Me bzw. GA-O-glucoside

\* XXXIII. Mitt., s. Lit. 1.

(0.1–1.0 mg) wurden entweder direkt mit BSA oder BSA + 10% TMCIS (200  $\mu$ l) bzw. nach Lösen in Acetonitril, Benzol oder wenig Pyridin bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluss umgesetzt. Von diesem Reaktionsgemisch war 1  $\mu$ l für eine Analyse ausreichend.

### Säulenfüllung

Es wurden ausschliesslich silanisierte Glassäulen benutzt, die bei 4 mm Innendurchmesser eine Länge von 1.5 m aufwiesen. Als stationäre Phasen wurden 3% QF-1 bzw. 2% SE-33 an Gas-Chrom Q (125–160  $\mu$ m) eingesetzt.

### Analysenbedingungen

Die Analysen wurden mit einem Pye-Gerät Modell "Panchromatograph" mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Die Ofentemperatur (Einlass, Säule und Detektor) betrug für die GA-Derivate bei isothermem Betrieb für SE-33 210° bei 165 ml Stickstoff/min und für QF-1 195° bei 150 ml Stickstoff/min. Die Derivate der GA-O-glucoside wurden an QF-1 isotherm bei 245° und 175 ml Stickstoff/min chromatographiert; für die Trennung von TMS-GA- und TMS-(GA-O-glucosid)-Derivaten war ein Temperaturprogramm von 195–245° bei 4°/min Heizrate und 140 ml Stickstoff/min (205°) geeignet.

### TABELLE I

RETENTIONSZEITEN ( $t_r$ ), RELATIVE RETENTIONEN ( $r$ ) UND TRENNSTUFENZAHL ( $n$ ) DER TMS-DERIVATE VON GIBBERELLINEN, GIBBERELLINMETHYLESTERN UND VERTRETERN WEITERER PHYTOHORMONGRUPPEN

Analysenbedingungen, s. Experimentelles.

TMS-Derivat von	2% SE-33						3% QF-1					
	Freien Säuren (TMS-GA-TMS)			Methylestern (TMS-GA-Me)			Freien Säuren (TMS-GA-TMS)			Methylestern (TMS-GA-Me)		
	$t_r$	$r$	$n$	$t_r$	$r$	$n$	$t_r$	$r$	$n$	$t_r$	$r$	$n$
GA <sub>1</sub>	29.5	7.8	870	23.0	6.1	900	14.6	3.5	680	13.4	3.2	860
GA <sub>2</sub>	40.5	10.7	890	28.5	7.6	810	22.5	5.4	960	18.8	4.5	940
GA <sub>3</sub>	27.0	7.1	480	22.5	5.9	680	13.8	3.3	460	12.1	2.9	620
GA <sub>4</sub>	19.0	5.0	980	14.0	3.7	1100	10.9	2.6	800	9.6	2.3	1080
GA <sub>5</sub>	16.7	4.4	1080	12.9	3.4	1080	10.4	2.5	800	9.2	2.2	950
GA <sub>6</sub>	22.5	5.9	880	17.8	4.7	1080	17.2	4.1	810	16.3	3.9	1020
GA <sub>7</sub>	18.2	4.8	670	14.0	3.7	990	12.1	2.9	820	11.3	2.7	800
GA <sub>8</sub>	46.5	12.3	850	35.0	9.4	810	20.0	4.8	720	16.7	4.0	870
GA <sub>9</sub>	10.6	2.8	940	8.0	2.1	1320	7.1	1.7	910	6.3	1.5	930
GA <sub>13</sub>	29.0	7.7	970	21.1	5.3	1030	4.2	1.0	670	5.0	1.2	780
5 $\alpha$ -Cholestan	34.0	8.9	1200	34.0	8.9	1200	4.2	1.0	700	4.2	1.0	800
Stearinsäure- methylester	3.8	1.0	1400	3.8	1.0	1430	—	—	—	—	—	—
cis-trans- Abcisinsäure	4.9	1.3	1000	4.2	1.1	940	1.2	0.3	670	2.9	0.7	800
3-Indolyl- essigsäure	1.9	0.5	960	1.4	0.4	1200	0.8	0.2	470	0.8	0.2	600
6-(Furfuryl- amino)-purin (Kinetin)	5.3	1.4	700	—	—	—	2.1	0.5	670	—	—	—

Als Standardsubstanzen benutzten wir je nach Trennproblem 5 $\alpha$ -Cholestan, Stearinsäuremethylester oder Progesteron.

Bei voller Empfindlichkeit des Gerätes ergaben 0.5  $\mu$ g TMS-GA<sub>4</sub>-TMS bzw. 1.0  $\mu$ g TMS-GA<sub>3</sub>-TMS 20% Zeigerausschlag.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die durchgeführten Silylierungsversuche zeigten, dass BSA gut geeignet ist, nicht nur Hydroxylgruppen, sondern auch Carboxylgruppen der Gibberelline glatt zu silylieren. Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion ist bei Raumtemperatur gering, kann aber durch Zusatz von 10% TMCIS beschleunigt werden. Eine rasche Reaktion erfolgt, wenn die GA-Probe in Pyridin gelöst mit BSA/10% TMCIS umgesetzt wird. Weitere mögliche Lösungsmittel sind u.a. Acetonitril und Benzol.

Wie aus Tabelle I hervorgeht, ergeben sowohl die TMS-Derivate der freien Gibberelline (TMS-GA-TMS) als auch die der Methylester (TMS-GA-Me) an QF-1 und SE-33 distinkte und scharfe Peaks. Die gefundenen Retentionen der TMS-GA-Me stimmen mit Ausnahme von TMS-GA<sub>3</sub>-Me gut mit den Literaturwerten<sup>6</sup> überein. Der Peak von TMS-GA<sub>3</sub>-Me erscheint unter unseren Standardbedingungen mit geringerer Retention als in der Literatur<sup>6</sup> beschrieben. Einen zusätzlichen Peak, der mit dem Literaturwert der Retention für TMS-GA<sub>3</sub>-Me übereinstimmt, finden wir, wenn bei der Silylierung extreme Bedingungen, wie z.B. GA<sub>3</sub>-Me-Überschuss bzw. Silylieren ohne Pyridin angewendet werden oder die Chromatographie in Stahlsäulen durchgeführt wird. Dieser Befund sowie die verringerte Trennstufenzahl *n* für TMS-GA<sub>3</sub>-Derivate (vgl. Tabelle I) deuten auf Zersetzung oder Umlagerung unter harten Analysenbedingungen hin. Da bei GA<sub>7</sub> ähnliche Tendenzen zu beobachten sind, dürfte die besondere Struktur des Ringes A beider Gibberelline dafür verantwortlich sein.

Ein Vergleich der Retentionen zeigt, dass mit Ausnahme von GA<sub>13</sub> die TMS-GA-TMS-Derivate regelmässig höhere Werte besitzen als die entsprechenden TMS-GA-Me-Derivate. Der Nachweis und die Trennung von Methylester und freier Säure

TABELLE II

RETENTIONSZEITEN ( $t_r$ ) UND RELATIVE RETENTIONEN ( $r$ ) DER TMS-DERIVATE VON GIBBERELLIN-O-GLUCOSIDEN UND DEREN METHYLESTERN AN 3% QF-1 UNTER ISOTHERMEN BEDINGUNGEN

Analysenbedingungen, s. Experimentelles.

TMS-Derivat von	Freien Säuren (TMS-GA-glucosid- TMS)		Methylestern (TMS-GA-glucosid- Me)	
	$t_r$ (min)	$r$	$t_r$ (min)	$r$
GA <sub>1</sub> -O(3)-glucosid	15.9	2.49	15.6	2.45
GA <sub>1</sub> -O(13)-glucosid	15.4	2.41	15.1	2.37
GA <sub>3</sub> -O(3)-glucosid	12.8	2.01	14.0	2.20
GA <sub>3</sub> -O(13)-glucosid	10.0	1.57	11.3	1.76
GA <sub>8</sub> -O(2)-glucosid	12.1	1.90	12.8	2.00
Allogibberinsäure-O(13)-glucosid	3.25	0.51	3.20	0.50
Progesteron	6.4	1.00	1.00	6.4
5 $\alpha$ -Cholestan	0.9	0.14		

gelingen an SE-33. An QF-1 sind die Unterschiede der Retentionen beider Derivate relativ gering.

Tabelle II enthält die Ergebnisse der Gaschromatographie von TMS-Derivaten nativer und synthetisierter GA-O-glucoside, sowie ihrer Methylester an QF-1. Bei diesen GA-Konjugaten konnte im Gegensatz zu den freien Gibberellinen kein einheitlicher Einfluss der Methylestergruppe auf die Retention festgestellt werden. Bemerkenswert ist der analytisch wichtige Unterschied zwischen den Retentionen der TMS-Derivate von GA<sub>3</sub>-O(3)-glucosid und dem neu synthetisierten GA<sub>3</sub>-O(13)-glucosid bzw. ihren Methylestern<sup>11</sup>.

Eine Charakterisierung von GA-O-glucosiden und den entsprechenden Agluca in einem Chromatogramm gelingt, wenn man dem sehr unterschiedlichen gaschromatographischen Verhalten ihrer TMS-Derivate durch ein Temperaturprogramm Rechnung trägt (Tabelle III).

TABELLE III

RETENTIONSZEITEN ( $t_r$ ) UND RELATIVE RETENTIONEN ( $r$ ) DER TMS-DERIVATE VON GIBBERELLIN-O-GLUCOSIDEN AN 3% QF-1 UNTER PROGRAMMIERTEN TEMPERATURBEDINGUNGEN (195–250°) MIT 4°/MIN HEIZRATE

Analysenbedingungen, s. Experimentelles.

TMS-Derivat von	$t_r$ (min)	$r$
GA <sub>1</sub>	10.0	1.90
GA <sub>1</sub>	10.0	1.90
GA <sub>8</sub>	10.4	1.95
GA <sub>1</sub> -O(3)-glucosid	22.7	4.25
GA <sub>3</sub> -O(3)-glucosid	21.5	4.04
GA <sub>8</sub> -O(2)-glucosid	20.7	3.90
5 $\alpha$ -Cholestan	5.3	1.00

## LITERATUR

- 1 B. Voigt und G. Adam, *Tetrahedron Lett.*, (1975), im Druck.
- 2 J. MacMillan, in H. Kaldewey und Y. Vardar (Herausgeber), *Hormonal Regulation in Plant Growth and Development; Proc. Advan. Study Inst., Izmir, 1971*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1972, S. 175.
- 3 J. E. Graebe, P. Hedden, P. Gaskin und J. MacMillan, *Phytochemistry*, 13 (1974) 1433.
- 4 T. Kagawa, F. Fukinbara und Y. Sumiki, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 27 (1963) 598.
- 5 N. Ikekawa, Y. Sumiki und N. Takahashi, *Chem. Ind. (London)*, (1963) 1728.
- 6 B. D. Cavell, J. MacMillan, R. J. Pryce und A. C. Sheppard, *Phytochemistry*, 6 (1967) 867.
- 7 P. A. Bartlett und W. S. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, (1970) 4459.
- 8 G. Schneider, unveröffentlicht.
- 9 L. A. Davis, D. E. Heinz und F. T. Addicott, *Plant Physiol.*, 43 (1968) 1389.
- 10 G. Schneider, *Tetrahedron Lett.*, (1972) 4053.
- 11 G. Schneider, G. Sembdner und K. Schreiber, *Z. Chem.*, 14 (1974) 474.